

Моделирование синдрома множественной лекарственной устойчивости в эксперименте на мышах с перевиваемой лимфосаркомой RLS₄₀

Сенькова А.В.¹, Шкляева О.А.², Агеева Т.А.¹, Зенкова М.А.²

Modeling of the multidrug resistance syndrome in experiment on mice with lymphosarcoma RLS₄₀

Sen'kova A.V., Shklyayeva O.A., Ageyeva T.A., Zenkova M.A.

¹ Новосибирский государственный медицинский университет, г. Новосибирск

² Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск

© Сенькова А.В., Шкляева О.А., Агеева Т.А., Зенкова М.А.

Введение

Множественная лекарственная устойчивость (МЛУ) злокачественных новообразований — одна из основных причин прогрессирования болезни и неэффективности лечения [1]. Резистентность опухолевых клеток к химиотерапии может быть следствием двух процессов: во-первых, неспособности противоопухолевого препарата запустить программу апоптоза в результате недостаточной внутриклеточной концентрации цитостатика, во-вторых, нарушений механизмов апоптоза в самих опухолевых клетках [2].

Установлено, что в основе одного из механизмов развития феномена МЛУ лежит снижение внутриклеточной концентрации противоопухолевых препаратов, обусловленное активным АТФ-зависимым выведением веществ в межклеточную среду. Такой транспорт осуществляется белком плазматической мембраны Р-гликопротеином (Р-gp), являющимся продуктом гена *MDR1*. Обладая широкой субстратной специфичностью, этот механизм обеспечивает выживание клеток не только в присутствии конкретного химиотерапевтического препарата, но и других цитостатиков, различных по структуре и механизму действия [3].

Развитие лекарственной резистентности также может быть связано с факторами, влияющими на апоптоз [4]. Цитостатики могут вызывать гибель клетки различными путями (образование разрывов и (или) сшивок в молекуле ДНК, алкилирование ДНК, деполимеризация микротрубочек веретена деления), но в конечном итоге все эти повреждения становятся сигналами для запуска апоптоза независимо от конкретного механизма действия противоопухолевого препарата.

Причиной лекарственной устойчивости могут являться мутации в гене *p53*, развивающиеся в процессе опухолевой трансформации и нарушающие его проапоптотическую функцию. В результате дефектного функционирования данного гена происходит накопление клеток с поврежденным геномом, что лежит в основе опухолевой прогрессии и делает клетку невосприимчивой к химиотерапевтическим препаратам [5].

Важную роль в регуляции апоптоза играет ген *bcl-2*, гиперэкспрессия которого делает клетки нечувствительными к проапоптотическим стимулам и вызывает резистентность опухолевых клеток ко многим повреждающим факторам (радиация, ультрафиолетовое излучение, тепловой шок, химические агенты, стероидные гормоны).

моны, вирусы), в том числе и к цитостатическим препаратам [6].

Основные механизмы возникновения МЛУ уже изучены и описаны в литературе, однако эти обширные знания еще в полной мере не нашли применения в практической онкологии, в частности в лечении гемобластозов — опухолей, для которых цитостатическая терапия является приоритетной [7]. Как правило, течение лейкозов и лимфом характеризуется наличием рецидивов, что предполагает проведение повторных курсов высокодозной полихимиотерапии, осложняющейся развитием и модификацией процессов множественной лекарственной устойчивости, детали механизмов которых до конца не ясны. В данной работе сделана попытка перенести ситуацию, зачастую происходящую в клинике, в экспериментальные условия, что в определенной степени поможет переосмыслить подходы к терапии гемобластозов.

Цель исследования — изучить механизмы формирования множественной лекарственной устойчивости в эксперименте на мышах с перевиваемой лимфосаркомой RLS_{40} , не чувствительной к индукции апоптоза и изначально проявляющей МЛУ-фенотип, который соответствует статусу опухоли у пациентов после полихимиотерапии (ПХТ) или опухоли, изначально не чувствительной к стандартным схемам ПХТ, которые используются в качестве терапии первой линии при большинстве гемобластозов.

Материалы и методы

Опыты проведены на 3–4-месячных мышамсамцах линии CBA/LacSto (CBA), полученных из виария Института цитологии и генетики СО РАН. Их содержали группами по 8–10 особей в пластиковых ванночках при естественном режиме освещения и обеспечивали им свободный доступ к воде и пище. В работе использовалась резистентная лимфосаркома RLS_{40} мышей, полученная из чувствительной к циклофосфану лимфосаркомы LS , эффект которого опосредуется путем запуска в опухолевых клетках апоптоза [8]. Устойчивость к апоптогенам была получена путем многократных внутримышечных перевивок рецидивов этой опухоли, возникаю-

щих после воздействия низких доз циклофосфана [9]. В результате последовательной культивации клеток линии RLS на среде с повышающейся концентрацией винбластина была получена клеточная линия RLS_{40} , которая имеет высокие уровни экспрессии генов МЛУ и поддерживается в культуре при концентрации винбластина 40 нмоль [10].

Суспензию клеток опухоли RLS_{40} в физиологическом растворе ($5 \cdot 10^6$ клеток/мл) объемом 0,1 мл трансплантировали внутримышечно мышам линии CBA для формирования солидной опухоли. На 7-й день опухолевой прогрессии мышей делили на две группы по 10 особей в каждой. Первой группе вводили стандартную комбинацию цитостатиков (схема СНОР), второй группе животных не вводили лекарственных препаратов (контроль). Препараты растворяли в физиологическом растворе непосредственно перед использованием и вводили в дозировках, рассчитанных методом графического пробит-анализа и составивших $1/5$ ЛД₅₀: циклофосфан — 50 мг/кг массы тела, доксорубин — 4 мг/кг массы тела, винкристин — 0,1 мг/кг массы тела однократно в хвостовую вену, преднизолон — 5 мг/кг массы тела в течение 5 дней внутривенно [8]. Контрольные животные получали инъекции физиологического раствора внутривенно. На 10-е сут после лечения (17-е сут роста опухоли) мышей умерщвляли методом цервикальной дислокации под эфирным наркозом. Животных препарировали, отделяли поверхностный пласт опухолевой ткани и помещали его в физиологический раствор во льду. Затем опухолевую ткань подвергали дезинтеграции, гомогенизации и двукратной фильтрации для приготовления суспензии опухолевых клеток. Часть суспензии использовали для перевивания интактным животным в количестве $5 \cdot 10^6$ клеток/мл в объеме 0,1 мл, а часть — для приготовления первичной культуры клеток. На 7-е сут после имплантации опухоли, подвергавшейся ПХТ, мышам снова проводили курс ПХТ (СНОР), а контрольную группу оставляли без лечения. Всего было проведено четыре пассажа опухоли на мышах. Такое перепассирование опухоли от одной мыши к

другой делали с целью провести как можно больше курсов ПХТ, воздействующих на одну и ту же опухоль, что невозможно сделать, проводя несколько курсов ПХТ на одном и том же животном из-за выраженного токсического воздействия цитостатиков на организм.

Динамику роста опухоли в месте перевивки отслеживали, периодически измеряя пораженную лапку штангенциркулем. Объем опухолей определяли путем перемножения трех взаимно перпендикулярных размеров опухоли. Торможение роста опухоли (ТРО) рассчитывали по формуле

$$\text{ТРО} = (V_{\text{контроль}} - V_{\text{опыт}}) / V_{\text{контроль}} \cdot 100\%,$$

где $V_{\text{контроль}}$ — средний объем опухолей в группе контроля; $V_{\text{опыт}}$ — средний объем опухолей в группе ПХТ.

Для гистологического исследования опухолевые узлы фиксировали в 10%-м растворе нейтрального формалина, для дальнейшей обработки вырезали образцы толщиной до 5 мм, обезвоживали их в спиртах возрастающей концентрации и заливали в парафин, парафиновые срезы толщиной 3–5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Морфометрическое исследование забранных образцов опухоли проводили при увеличении микроскопа $\times 1000$ с использованием вмонтированной в окуляр сетки на 25 точек. Подсчет проводили в 10–15 полях зрения каждого препарата от 10 животных в каждой из указанных выше групп. Тем самым было выполнено по 100–150 определений морфометрических параметров соответствующих структур на группу экспериментальных животных [11]. На гистологических препаратах опухоли подсчитывали объемные плотности (V_v) некрозов и апоптозов в ткани опухоли. Дифференцирование данных объектов проводили на основании специфических морфологических изменений цитоплазмы и ядра.

Суспензию опухолевых клеток RLS_{40} наслаивали на 3 мл среды LSM, центрифугировали при 1 500 об/мин в течение 15 мин. Мононуклеарную фракцию клеток, находящуюся на границе раздела LSM и супернатанта, переносили в чистую пробирку, содержащую

5–7 мл PBS, суспендировали и центрифугировали при 1 000 об/мин в течение 5 мин. Клеточный осадок помещали в среду IMDM, содержащую 10%-ю бычью сыворотку и 1%-й раствор антибиотиков и антимикотика (100 ед/мл пенициллина, 0,1 мг/мл стрептомицина и 0,25 мкг/мл амфотерицина), и культивировали в атмосфере 5%-го CO_2 при температуре 37 °С. Клетки пересевали каждые 3 дня для поддержания экспоненциального роста.

Суммарную клеточную РНК выделяли из культивируемых клеток с помощью SDS (фенольной) экстракции согласно методике, описанной в литературе [12]. Для предотвращения деградации РНК все операции проводили во льду. Концентрацию РНК определяли спектрофотометрически, сохранность выделенной РНК проверяли с помощью электрофореза в 1%-й агарозе.

Определение уровней мРНК генов *mdr1a*, *mdr1b*, *bcl-2*, *p53* в клетках первичных культур RLS_{40} после каждого курса ПХТ проводили методом ОТ-ПЦР с использованием в качестве внутреннего стандарта мРНК β -актина.

Для синтеза кДНК использовали суммарную РНК клеток RLS_{40} . кДНК получали в реакционной смеси объемом 20 мкл, содержащей трис-HCl 50 ммоль, pH = 8,3, KCl 75 ммоль, MgCl_2 3 ммоль, DTT 0,01 моль, 2 мкг суммарной клеточной РНК, 0,5 ммоль каждого из дезоксинуклеозидтрифосфатов, 12 пмоль рандомизированного гексануклеотидного праймера и 20 ед акт. обратной транскриптазы M-MLV. Реакцию синтеза кДНК проводили при температуре 37 °С в течение 1 ч. Полученные образцы кДНК либо непосредственно использовали для проведения ПЦР, либо хранили при температуре -20 °С.

Последовательности специфических праймеров к генам *mdr1a*, *mdr1b*, *bcl-2*, *p53* и β -актину для проведения ПЦР были выбраны с использованием программы OLIGOS и на основании литературных данных: *mdr1a* (прямой — 5'-GCAGGTTGGCTAGACAGGTTGT-3', обратный — 5'-GAGCGCCACTCCATGGATAA-3', 69 п.н.), *mdr1b* (прямой — 5'-CTGCTGTTGGCGTATTGGG-3', обратный — 5'-TGGCAGAATACTGGCTTCTGCT-3', 170 п.н.), *bcl-2* (прямой — 5'-TCGCAGAGATGTCCAGTCAGC-3', обратный — 5'-CATCCAGCCTCCGTTATCC-3', 255 п.н.), *p53* (прямой —

5'-GAACCGCCGACCTATCCTTAC-3', обратный — 5'-GTTTGG-GCTTCTCCTTGAT-3', 412 п.н.), β -актин (прямой — 5'-AGCCATGTACGTAGCCATCCA-3', обратный — 5'-TCTCCG-GAGTCCATCACAATG-3', 81 п.н.).

Для получения специфических продуктов генов *mdr1a* и *mdr1b* использовали 26-й и 24-й циклы амплификации соответственно; для генов *bcl-2* и *p53* использовали 31-й цикл амплификации. Праймеры β -актина добавляли в реакционную смесь для генов *mdr1a*, *mdr1b* после 3-го и 1-го цикла соответственно, для генов *bcl-2* и *p53* — после 6-го цикла. Амплификацию проводили в следующих условиях: 1 цикл, денатурация при температуре 95 °С 5 мин; плавление праймеров при температуре 57 °С 1 мин; элонгация — 72 °С 1 мин. Следующие циклы амплификации проводили в условиях: 94 °С 1 мин; 57 °С 1 мин; 72 °С 1 мин. Последний цикл амплификации, элонгацию, проводили в течение 5 мин при температуре 72 °С. Отсутствие загрязнений в ПЦР контролировали при замене кДНК пробы на чистую дистиллированную воду. Продукты ПЦР разделяли с помощью 8%-го ПААГ электрофореза в нативных условиях. Полученные изображения полос обрабатывали с помощью компьютерной денситометрии (Gel-Pro Analyzer 4.0). Для определения уровня экспрессии мРНК интегральную оптическую плотность полос, соответствующих ген-специфическим ПЦР-продуктам, нормализовали на оптическую плотность продукта β -актина.

Статистическую обработку результатов осуществляли с использованием параметрического критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

У всех животных на 7-е сут в месте перевивки формировался солидный опухолевый узел, достигавший объема приблизительно 0,16 см³. Введение ПХТ достоверно уменьшало размеры опухолевого узла, хотя и не вызывало полной регрессии опухоли в месте перевивки, т.е. независимо от номера пассажа и сроков наблюдения ПХТ была эффективна. Степень эффективности была различной в зависимости

от числа курсов ПХТ, воздействовавших на опухоль: на начальных этапах лечения (1–2-й курс ПХТ) наблюдалось усиление эффекта от химиотерапии, при последующих же курсах отмечалось снижение эффективности лечения (3–4-й курс ПХТ) (рис. 1).

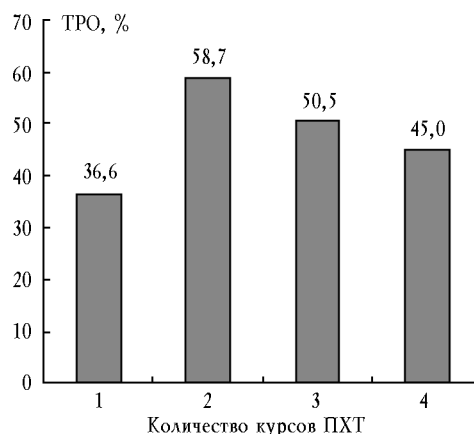


Рис. 1. Торможение роста опухоли RLS₄₀ после нескольких курсов ПХТ (на 6-е сут после введения цитостатиков)

При микроскопическом исследовании было выявлено, что гистологически опухолевый узел построен из мономорфных атипичных лимфоидных клеток с частыми митозами. Рост опухоли инвазивный, с разрушением мышц бедра. Метастазы определялись в печени, легких, почках и располагались преимущественно периваскулярно. В ткани опухоли как без лечения, так и после введения цитостатиков наблюдали гибель клеток как путем некроза, так и путем апоптоза, причем объем деструктивных изменений в ткани опухоли после введения ПХТ был в 1,6 раза больше по сравнению с нелеченой опухолью (таблица). Объемная плотность апоптозов в ткани опухоли после четырех курсов ПХТ достоверно уменьшалась, тогда как доля некрозов оставалась на том же уровне. Следовательно, после цитостатического воздействия уменьшается способность опухоли подвергаться апоптозу под действием цитостатиков, что может быть связано с изменением функционирования генов, регулирующих этот процесс.

Опухоль RLS₄₀ исходно характеризуется высоким уровнем экспрессии гена *mdr1b* [10], но после четырех курсов ПХТ выявлено еще

большее увеличение уровня экспрессии этого гена. На рис. 2 приведены уровни экспрессии исследуемых генов в клетках опухоли RLS₄₀ после лечения цитостатиками по сравнению с клетками интактной опухоли. Уровни экспрессии генов *mdr1b*, *bcl-2* и *p53* в клетках опухоли после четырех курсов ПХТ возросли по сравнению с исходной опухолью в 1,3; 2,3 и 1,6 раза соответственно. Экспрессия гена *mdr1a* не изменилась.

Гиперэкспрессия генов семейства *mdr1*, продуктом которых является мембранный белок Р-гликопротеин, «откачивающий» цитостатиче-

ские препараты из опухолевой клетки, обуславливает резистентность исследуемой опухоли к индукции апоптоза [13]. Причем Р-гликопротеин, кодируемый геном *mdr1b*, вносит гораздо больший вклад в формирование и усиление МЛУ лимфосаркомы RLS₄₀, чем кодируемый геном *mdr1a* [14]. Это может быть связано с тем, что у мышей ген *mdr1a* «молчащий», а *mdr1b* является аналогом человеческого *MDR1*, более лабильного и активируемого различными воздействиями, в том числе и химиотерапевтическими агентами [15].

Результаты морфометрии гистологических срезов опухоли RLS₄₀ без лечения и после нескольких курсов ПХТ ($M \pm m$)

Исследуемый параметр	RLS ₄₀ без лечения	RLS ₄₀ с 1 курсом ПХТ	RLS ₄₀ и 2 курсов ПХТ	RLS ₄₀ и 3 курсов ПХТ	RLS ₄₀ и 4 курсов ПХТ
vv неповрежденной ткани опухоли	60,95 ± 1,9	33,2 ± 3,55	36,24 ± 3,9	36,9 ± 3,4	38,4 ± 4,3
vв некрозов в опухолевой ткани	23,8 ± 1,6	46,3 ± 3,4	43,04 ± 3,74	45,0 ± 3,4	49,4 ± 4,5
vв апоптозов в опухолевой ткани	15,3 ± 0,97	20,6 ± 1,97*	20,4 ± 2,2	18,1 ± 1,7	12,13 ± 1,64*
vв суммарных деструктивных изменений	39,0 ± 1,9	66,8 ± 3,55	63,4 ± 3,9	63,1 ± 3,4	61,5 ± 4,3

Примечание.* — достоверные отличия аналогичных параметров при $p \leq 0,05$; vv — объемная плотность структуры, %.

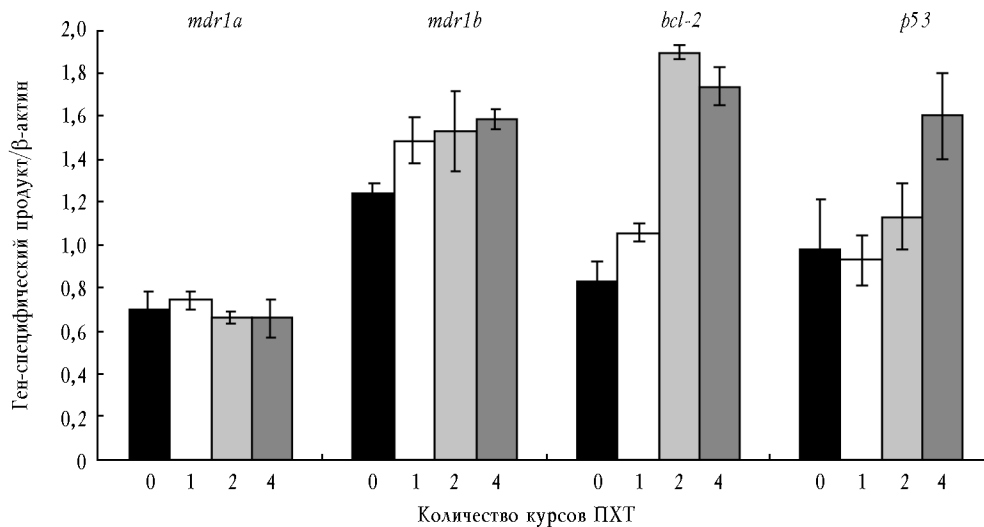


Рис. 2. Изменение уровней экспрессии генов *mdr1a*, *mdr1b*, *bcl-2* и *p53* в клетках лимфосаркомы мышей RLS₄₀ после нескольких курсов ПХТ. Данные ОТ-ПЦР

Повышение экспрессии гена *p53* может быть связано с образованием и накоплением его мутантных форм, которые обнаруживают в большом числе опухолей [4, 5]. Клетки, в которых отсутствует *p53* дикого типа, являются резистентными практически ко всем формам ин-

дукции апоптоза, а трансфекция гена *p53* дикого типа восстанавливает способность опухолевых клеток индуцировать апоптоз. Кроме того, выявленное при гистологическом исследовании снижение способности опухоли подвергаться апоптозу после воздействия нескольких курсов

ПХТ свидетельствует о том, что ген *p53* неадекватно выполняет свою функцию. Вероятно, в данном исследовании наблюдается гиперэкспрессия мутантного *p53*, продукт которого выполняет функцию онкобелка.

Гиперэкспрессия гена *bcl-2* препятствует запуску апоптоза в клетках под действием цитостатиков. Существует мнение, что поврежденные клетки с гиперэкспрессией гена *bcl-2* могут выживать (в результате селекции опухолевого клона), приобретать дополнительные вторичные мутации, в результате которых появляются другие механизмы лекарственной устойчивости (например, гиперэкспрессия гена *MDR1*) [6].

Заключение

Полученные данные свидетельствуют о том, что полихимиотерапия, проводимая при гемобластозах, сопровождается увеличением экспрессии генов МЛУ и нарушением механизмов апоптоза. Исходя из представлений, что опухоль представляет собой гетерогенную популяцию клеток, можно предположить, что после воздействия нескольких курсов ПХТ в результате клональной селекции выживают клетки, способные избежать цитотоксического эффекта цитостатиков, т.е. те клетки, в которых ярко выражены механизмы резистентности к повреждающим воздействиям.

Проведение стандартной ПХТ при опухолях, изначально проявляющих МЛУ-фенотип, что нередко встречается при лимфомах высокой степени злокачественности, может способствовать усилению МЛУ в клетках, выживших в результате клональной селекции. С этой точки зрения может являться обоснованным более раннее назначение высокодозной ПХТ, поскольку проведение высокодозного лечения после полного курса стандартной терапии первой линии может быть неэффективным из-за выраженного фенотипа МЛУ опухоли и ограниченных компенсаторных возможностей организма перенести эту терапию.

В клинической практике целесообразно определять уровни экспрессии генов МЛУ (*MDR*, *MRP*, *LRP*, *BCRP*), а также маркеров апо-

птоза (*p53*, *bcl-2*), что может являться основанием для индивидуализации программной ПХТ. При высоком уровне данных маркеров может быть оправдан изначальный выбор более агрессивных программ ПХТ в качестве терапии первой линии.

Литература

1. Штиль А.А. Множественная лекарственная устойчивость опухоли и механизм-специфическая химиотерапия: противоречие? // Гематология и трансфузиология. 2004. Т. 49. № 3. С. 30–34.
2. Поспелова Т.И., Лосева М.И., Ковынев И.Б. и др. Основы опухолевой прогрессии гемобластозов // Бюл. СО РАМН. 2004. Т. 112. № 2. С. 73–76.
3. Ставровская А.А. Клеточные механизмы множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток // Биохимия. 2000. Т. 65. № 1. С. 112–126.
4. Владимирская Е.Б., Масчан А.А., Румянцев А.Г. Апоптоз и его роль в развитии опухолевого роста // Гематология и трансфузиология. 1997. Т. 42. № 5. С. 4–9.
5. Лукьянова Н.Ю., Кулик Г.И., Чехун В.Ф. Роль генов *p53* и *bcl-2* в апоптозе и лекарственной резистентности опухолей // Вопр. онкологии. 2000. Т. 46. № 2. С. 121–129.
6. Reed J.C. Bcl-2 family proteins: regulators of apoptosis and chemoresistance in hematologic malignancies // Seminars in Hematology. 1997. V. 34. № 4. P. 9–19.
7. Filipits M. Mechanisms of cancer: multidrug resistance // Drug Discovery Today. 2004. V. 1. № 2. P. 229–234.
8. Каледин В.И., Николин В.П., Агеева Т.А. и др. Циклофосфамид – индуцированный апоптоз клеток мышинной лимфосаркомы в условиях *in vivo* // Вопр. онкологии. 2000. Т. 46. № 5. С. 588–593.
9. Каледин В.И., Попова Н.А., Андреева Е.М. Изучение эффективности моно- и полихимиотерапии на модели перевиваемой мышинной лимфосаркомы, не чувствительной к индукции апоптоза // Вопр. онкологии. 2006. Т. 52. № 1. С. 70–73.
10. Mironova N., Shklyayeva O., Andreeva E. et al. Animal model of drug-resistant tumor progression // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2006. V. 1091. P. 490–500.
11. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия: Руководство. М.: Медицина, 1990. 384 с.
12. Chattopadhyay N., Kher R., Godbole M. Inexpensive SDS/phenol method for RNA extraction from tissues // Biotechniques. 1993. V. 15. P. 24–26.
13. Гришанова А.Ю., Мельникова Е.В., Каледин В.И. и др. Возможная роль Р-гликопротеина в устойчивости к циклофосфамиду перевиваемой мышинной лимфосаркомы RLS // Бюл. экспер. биологии и медицины. 2005. Т. 139. № 5. С. 573–577.
14. Андреева Е.М., Миронова Н.Л., Шкляева О.А. и др. Участие генов *mdr1a*, *mdr1b*, *p53* и *bcl-2* в формировании устойчивости клеток лимфосаркомы RLS мышей к терапевтическому действию циклофосфана // Вестн. НГУ. 2006. Т. 4. № 1. С. 21–26.
15. Hartmann G., Kim H., Piquette-Miller M. Regulation of the

hepatic multidrug resistance gene expression by endotoxin and inflammatory
cytokines in mice // Int. Immunopharmacol. 2001. V. 1. № 2. P. 189 —199.